

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE APARECIDA DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO E
EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX EM CÉLULAS
EUCARIÓTICAS**

CURITIBA

2008

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

DANIELE APARECIDA DE OLIVEIRA

CONSTRUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Patologia como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof. ^a Dr. ^a Adriana Frohlich Mercadante

Co-orientadora:

Aline Carbonera Luvizon

CURITIBA

2008

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

Aos meus pais, Israel de Oliveira e Sonia Maoski de Oliveira, por todo o apoio, carinho e amor dedicado a mim.

As minhas queridas orientadoras, Adriana Frohlich Mercadante e Aline Carbonera, por terem sido essencias na construção do meu saber.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

“Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra... O Senhor é quem me guarda: o Senhor é a minha sombra à minha direita... O Senhor guardará a minha entrada e a minha saída, desde agora e para sempre”.

(Salmo 121)

“... que a glória seja dada a Deus, o qual, por meio do seu poder que age em nós, pode fazer muito mais do que nós pedimos ou até pensamos...”.

(Efésios 3:21)

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pela vida e por estar sempre comigo.

Aos meus pais, pela educação que eles me proporcionaram, por todos os ensinamentos, por todo amor e por todos os investimentos.

Ao meu namorado, Darlan Nicolodi, que fez todo o seu possível e impossível para me ver bem e feliz e suportou firme minhas crises de choro, irritação e surtos.

A minha orientadora, professora Adriana, por toda ajuda, carinho e dedicação e principalmente por me acolher e me ensinar.

A minha co-orientadora, exemplo e amiga, Aline, por tudo que me ensinou, pelos “puxões de orelha” e por toda a paciência.

Ao meu grande e melhor amigo Daniel Moura, por estar sempre ao meu lado, em momentos agradáveis, difíceis outros sem explicação e por todos os conselhos.

A Michele Dietrich por toda ajuda e por estar sempre disposta a me ensinar.

Ao meu amigo Celso por toda ajuda, por arrumar minhas figuras e por horas de conversas e risadas.

Aos meus amigos do laboratório de Neurobiologia Chelin, Luiz, Mônica, Celso, Bia, Márcia, Giuseppe, Silvia, Vivi, Mari, Kátia, Sofia, Heloisa e Axel por sempre me ensinarem algo novo tornarem os meus dias mais agradáveis.

As minhas amigas Fábíola e Fernanda por tudo que significam para mim.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre Câncer pelo auxílio no sequenciamento.

Ao professor Zanata por me dar a oportunidade de ser uma de suas alunas e por me proporcionar o conhecimento.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

RESUMO

Sulfidril Oxidases são enzimas que possivelmente participam da formação de pontes dissulfeto e dobramento oxidativo de várias proteínas. Um membro desta família de sulfidril oxidases é a Quiescina/sulfidril oxidase (QSOX). O gene das enzimas QSOX é amplamente distribuído em eucariotos, e já foi descrito em protistas, plantas e metazoários, não sendo encontrado em fungos. Estudos demonstram que estas enzimas são encontradas extracelularmente em tipos celulares associados com vias secretoras. O destino extracelular de QSOX sugere que esta possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou na sua sinalização celular principalmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto, que são requeridas para o apropriado dobramento, função e estabilidades protéicas. Em humanos foram descritos dois genes para estas enzimas; QSOX1 (Q6) e QSOX2 (QSOXN) que são encontrados em cromossomos distintos. QSOX1 é consideravelmente mais abundante nos tecidos de mamíferos que QSOX2. QSOX1 possui duas isoformas; um transcrito longo (QSOX V1) e um transcrito curto (QSOX V2). Embora na literatura existam muitos estudos sobre QSOX, ainda não se sabe suas reais funções e a regulação da expressão desta proteína. Nosso objetivo foi a produção de ferramentas que venham a auxiliar em seu estudo, com a construção de vetores para a expressão de QSOX em células de mamíferos. Para produção destas ferramentas utilizamos dois vetores (pcDNA 3.1 (-) e pSECTag2/Hygro), para que fosse possível a expressão da proteína QSOX em células de mamíferos e assim estudar e entender melhor sua funcionalidade. Para a amplificação das variantes V1 e V2 foi necessário o desenho de iniciadores e assim produzir os insertos para construção dos vetores. Através da utilização das técnicas de clonagem gênica construímos os vetores que foram submetidos a reações de sequenciamento de bases para análise da integridade dos insertos. Por fim, um dos vetores obtidos foi utilizado para transfecção em células HEK 293T e a expressão da proteína QSOX V2 nestas células foi verificada através de ensaio de “Western Blotting” com anticorpo anti-QSOX. Contudo, não foi possível detectar a proteína recombinante nestas células.

Palavras-chave: Sulfidril oxidases. Quiescina/sulfidril oxidase (QSOX), expressão de proteínas em sistema heterólogo, clonagem, vetor de expressão

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	Microlitro
ALR	Proteína de regeneração hepática
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CO_2	Dióxido de carbono
CXXC	Motivo redox-ativo
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo fosfato
ERV1p	Proteína essencial para respiração e crescimento em leveduras
FAD	Flavina adenina dinucleotideo
GR	Gene Ruller
IFN- γ	Intérferon gama
Ig k	Seqüência líder da cadeia leve Kappa de Imunoglobulinas
M	Molar
MgCl	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
QSOX	Quiescina /sulfidril oxidase
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{sc}	RNA de pequena subunidade

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com a utilização da enzima transcriptase reversa.
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
TRX	Tiorredoxina
UV	Ultravioleta
Λ H	Lambda Hind
μ g	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SULFIDRIL OXIDASES.....	1
1.1.1 ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA FAMÍLIA DE ENZIMAS QSOX.....	1
1.1.2 LOCALIZAÇÃO DAS ENZIMAS QSOX.....	2
1.1.3 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS QSOX.....	5
1.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS .	7
1.2.1 VETORES UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO DE QSOX EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	8
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
3 MATERIAIS E METÓDOS.....	14
3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS BALB C.....	14
3.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	14
3.3 DESENHO DE INICIADORES PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS VARIANTES 1 E 2 DA PROTEÍNA QSOX.....	15
3.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA QSOX V1 E V2 E EXTRAÇÃO DO INSERTO PARA CONSTRUÇÃO DO VETOR.....	17
3.5 DIGESTÃO FRAGMENTOS QSOX E DOS PLASMÍDEOS	17
3.5.1 Preparação do Inserto	17
3.5.2 Preparação do vetor	18
3.6 LIGAÇÃO DO cDNA AOS VETORES pcDNA 3.1 (-) E pSEC-Tag Hygro.....	18
3.7 PRECIPITAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PLASMÍDEO-INSERTO	19
3.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	19
3.9 PCR DE COLÔNIA	20
3.10 OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO DE VETORES ATRAVÉS DA PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA.....	21
3.11 SEQUENCIAMENTO	21
3.12 PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA CONSTRUÇÃO pSECTag2/Hygro QSOX V2	22
3.13 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX VARIANTE 2 EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	23
3.14 ENSAIO DE “WESTERN BLOTTING”	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES.....	25
4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA E INTEGRIDADE DO INSERTO	29
4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	32
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 SULFIDRIL OXIDASES

Sulfidril Oxidases são enzimas que participam possivelmente da formação de pontes dissulfetos e dobramento oxidativo de várias proteínas, através da oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (THORPE *et al.*, 2002).



Até o momento, foram descritas duas classes principais de sulfidril oxidases e a classificação se baseia no cofator utilizado para essas enzimas. São as enzimas Sulfidril Oxidases Metalodependentes (contêm cobre ou ferro); e as Sulfidril Oxidases dependentes de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) (THORPE *et al.*, 2002).

1.1.1 ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA FAMÍLIA DE ENZIMAS QSOX

Um membro da família de proteínas sulfidril oxidases é a Quiescina /sulfidril oxidase (QSOX) que são proteínas que contêm um domínio tiorredoxina (TRX)/proteína dissulfeto isomerase (PDI) na extremidade N-Terminal, e um pequeno domínio homólogo à proteína ERV1p de leveduras (próximo à região C-Terminal). Este é o domínio que se liga a FAD e catalisa a formação de pontes dissulfeto (THORPE *et al.*, 2002; HOOBER *et al.*, 1999a). Este arranjo de domínios foi inicialmente reconhecido na proteína QSOX, cuja expressão encontrava-se aumentada quando fibroblastos

humanos entravam em quiescência, e, portanto foi denominado quiescina (COPPOCK *et al.*, 1993).

No esquema abaixo (figura 1) é possível observar o arranjo típico de domínios e aspectos estruturais encontrados nas enzimas QSOX.

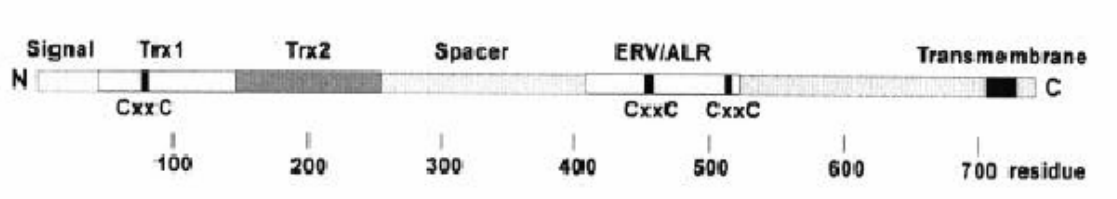


Figura 1: Esquema ilustrativo dos domínios da proteína QSOX de clara de ovo de galinha. Os domínios estão desenhados aproximadamente em escala. As linhas verticais em negrito representam os três motivos redox-ativos CXXC. A caixa sólida à direita representa a região transmembrana com a região C-terminal voltada para o citoplasma. (Fonte: Coppock & Thorpe, 2005).

As seqüências QSOX iniciam-se com uma seqüência sinal, consistente com a localização no interior do retículo endoplasmático (ER). Em seguida, aparece o domínio tiorredoxina (TRX1) contendo o motivo redox-ativo CXXC. A Figura 1 mostra ainda um segundo domínio tiorredoxina (TRX2), sem o motivo CXXC. Após uma região espaçadora de aproximadamente 270 aminoácidos, inicia-se o domínio ERV1/ALR. Seguindo o domínio ERV1/ALR inicia-se a região C-Terminal altamente variável de aproximadamente 200 aminoácidos, passível de “splincing” alternativo (COPPOCK *et al.*, 2000).

1.1.2 LOCALIZAÇÃO DAS ENZIMAS QSOX

O gene das enzimas QSOX é amplamente distribuído em eucariotos e já foi descrito em protistas (*Trypanosoma brucei*), plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Oryza*

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

sativa) e metazoários (vertebrados e *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*). Estas enzimas não foram encontradas em fungos (incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*).

Evidências na literatura indicam que algumas sulfidril oxidases como as encontradas na clara do ovo de galinha (HOOBER *et al.*, 1996; HOOBER *et al.*, 1999b), fibroblastos de pulmão humano (COPPOCK *et al.*, 1993), trato reprodutivo masculino e fluído de vesículas seminais (OSTROWSKY ; KESTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001), epiderme de camundongo (MATSUBA *et al.*, 2002) são todos membros da família de enzimas quiescina sulfidril oxidases.

Estudos imuno histoquímicos mostram uma ampla expressão de sulfidril oxidases em uma variedade de tecidos, e a localização dessa expressão é bastante específica. Essas enzimas são encontradas extracelularmente e em tipos celulares associados com vias secretoras, como a superfície secretória luminal de células epiteliais, sítios envolvidos na secreção apócrina, células do ducto epitelial da parótida, ilhotas de Langerhans, trato reprodutivo, entre outros (THORPE *et al.*, 2002). O destino extracelular de QSOX sugere que esta possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou na sinalização celular principalmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto dentro de uma mesma proteína ou entre proteínas distintas, pois proteínas secretadas e os domínios extracelulares de proteínas de membrana contêm ligações dissulfeto que são requeridas para o apropriado dobramento, função e estabilidades protéicas (THORPE *et al.*, 2002). Entretanto, QSOX também já foi encontrada intracelularmente, no retículo endoplasmático, complexo de Golgi (COPPOCK *et al.*, 2000; MAIRET-COELLO *et al.*, 2005), grânulos secretórios (MAIRET-COELLO *et al.*, 2005; MATSUI *et al.*, 1996), e nos grânulos densos centrais da glândula pituitária. Em humanos foram descritos 2 genes para estas enzimas: QSOX1 (Q6) e QSOX2 (QSOXN). Estes genes são encontrados em cromossomos distintos. O gene QSOX1 está localizado no cromossomo 1 (1q24) e o QSOX2 no cromossomo 9 (9q34. 3) (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002).

A expressão de QSOX1 em humanos tem sido associada com as ilhotas de Langherans; glândula parótida; glândulas apócrifas da pele e; células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (COPPOCK & THORPE, 2006) e em tecidos derivados

principalmente da mesoderme e ectoderme (PORTES *et al.*, 2007). A segunda forma do gene QSOX (QSOXN ou QSOX 2), foi caracterizada em células de neuroblastoma humano, homologa aos membros da família Q6. A QSOX2 tem sua localização predominante na membrana plasmática e nuclear (WITTKE *et al.*, 2003). Wittke (2003) demonstrou também que a inativação de QSOX2 confere resistência à apoptose induzida por IFN- γ , e que a indução da expressão de QSOX2 sensibiliza as células à apoptose. Desta maneira percebe-se que a proteína QSOX está presente em uma vasta variedade de locais na célula, demonstrando talvez suas múltiplas funções intracelulares e extracelulares em diversos tipos de tecidos.

QSOX1 é consideravelmente mais abundante nos tecidos de mamíferos que QSOX2. QSOX1 pode sofrer processamento alternativo do RNAm levando a formação de duas isoformas (COPPOCK & THORPE, 2006), corroborando os resultados de Radom e colaboradores (2006) que demonstraram a existência de duas seqüências de cDNA para QSOX em córtex cerebral de rato, sendo um transcrito longo (r QSOX – L ou QSOX V1) e um transcrito curto (r QSOX – S ou QSOX V2), os quais diferem por 851 nucleotídeos devido ao *splicing* alternativo.

Até o momento QSOX2 foi encontrada somente associada às membranas nucleares e citoplasmáticas. Porém quando células de neuroblastoma são induzidas à apoptose com IFN- γ , observou-se que QSOX2 é translocada para outro compartimento celular ainda não caracterizado (WITTKE *et al.*, 2003). WITTKE propõem que a função/localização desta enzima pode ser modulada por estímulos exógenos.

Levando-se em consideração que os papéis específicos desempenhados por QSOX na fisiologia celular e dos organismos ainda não foram identificados, a localização e a expressão desta família de proteínas fornecem pistas que podem auxiliar na elucidação da funcionalidade e substratos específicos das diferentes sulfidril oxidases dependentes de FAD.

1.1.3 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS QSOX

Estas supostas funções para QSOX induzem ao conceito de que estas proteínas exercem papel central na geração de pontes dissulfetos *in vivo*. Todavia, deve-se levar em consideração que o único estudo detalhado da especificidade enzimática foi feita apenas com QSOX de ave; não há estudos de animais nocaute ou mutantes para QSOX de vertebrados; desconhece-se mutações que gerem processos patológicos; e as vias para a interconversão de tióis e dissulfetos possuem múltiplos catalisadores e abrangem processos com especificidades sobrepostas. Dessa forma, é possível que QSOX possa introduzir dissulfetos em uma pequena parcela de peptídeos e proteínas, que dependem do substrato protéico e tipo celular em questão (COPPOCK & THORPE, 2006).

É importante mencionar que a expressão do gene QSOX (Q6) de humanos inicialmente denominada quiescina Q6, como já dito anteriormente, é baixa em fibroblastos em proliferação. Porém, sua expressão é induzida quando fibroblastos entram em quiescência. A maior expressão gênica sugere que esta proteína esteja envolvida no processo normal de quiescência celular reversível e, portanto a inibição desta poderia levar a processos patológicos como câncer (COPPOCK *et al.*, 1998). Vários genes são expressos durante a quiescência celular reversível, incluindo 4 tipos colágenos e decorinas, que são componentes da matriz extracelular. Estas proteínas secretadas possuem múltiplas pontes dissulfeto essenciais para a integridade estrutural da matriz. Por exemplo, a formação de pontes dissulfeto em muitos colágenos é requerida para o arranjo trimérico destas proteínas que também são necessárias para geração das redes de colágeno extracelular (COPPOCK *et al.*, 1998).

Assim, pelo que foi exposto acima, a ampla distribuição de QSOX em várias espécies e em diferentes tecidos sugere que essa oxidase possui um papel biológico importante. Além disso, evidências na literatura indicam que essa enzima possa desempenhar papéis importantes no dobramento protéico oxidativo. No entanto, as reais funções desempenhadas por QSOX e a regulação da expressão desta proteína ainda precisam ser esclarecidas. Na tentativa de se elucidar algumas das funções de

estudo. Tais ferramentas foram produzidas pelo nosso grupo e incluíram a expressão de QSOX em sistema heterólogo (bactérias), a produção de anticorpos e o emprego destes anticorpos em ensaios bioquímicos e de localização tecidual (IKEGAMI, 2006).

Trabalhos recentes têm demonstrado evidências do envolvimento da ontogenia celular e dos organismos, assim como a participação na modulação da sinalização celular e dobramento correto de proteínas. Portanto torna-se bastante interessante avaliar a expressão de QSOX e buscar proteínas que com ela interagem, numa tentativa de melhor se compreender a sua funcionalidade.

O nosso grupo demonstrou a presença de QSOX ativa em soro fetal bovino (ZANATA *et al.*, 2005), em tecidos derivados principalmente da mesoderme e ectoderme (PORTES *et al.*, 2007). Há hipóteses sobre a relevância de QSOX durante o desenvolvimento, contudo é necessária a realização de mais estudos para melhor esclarecer o papel funcional destas enzimas. Também estamos conduzindo trabalhos que visam estudar a expressão de QSOX durante o remodelamento vascular e sugerir parcerias moleculares com outras proteínas para tentar elucidar suas funções, estamos também produzindo RNA de interferência por PCR *real time* e a construção de duas proteínas QSOX *mouse* V2 mutada na cisteína 73-472. Há também, ensaios de imunohistoquímica (para inferir a localização tecidual de QSOX), imunoprecipitação com QSOX nativa e avaliação da atividade enzimática da proteína recombinante; estes últimos visam a identificação de possíveis substratos e parceiros moleculares das sulfidril oxidases dependentes de FAD.

O presente trabalho tem como objetivo a construção de vetores para a expressão de QSOX em células de mamíferos. Com isso, outra ferramenta estaria disponível para os estudos do nosso grupo: Uma QSOX com a conformação idêntica à nativa, já que as modificações pós-traducionais necessárias serão realizadas nas células em questão. Diferentemente, a QSOX recombinante disponível atualmente no laboratório foi produzida em bactérias e, portanto, não apresenta essas modificações que podem ser importantes para a sua atividade.

1.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

As células dos organismos eucariontes possuem uma complexa maquinaria para seu correto funcionamento da célula que acarreta muitas vantagens quando se necessita utilizar células eucarióticas para realizar a expressão de proteínas, como é o caso do nosso trabalho.

As células eucarióticas possuem organelas que lhes proporcionam vantagens na expressão de proteínas, como o retículo endoplasmático (RE), local em que ocorre a formação de pontes dissulfídicas; e também ajudam a estabilizar a estrutura da proteína; a conversão das proteínas em glicoproteínas através de ligações covalentes de cadeias curtas de oligossacarídeos, processo chamado de glicosilação que proporciona o correto dobramento protéico, que auxilia na proteção das proteínas contra degradação e também auxilia no correto transporte das proteínas para a vesícula adequada onde ocorrerá o empacotamento. É importante citar o complexo de Golgi que recebe as proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático e modifica seus oligossacarídeos distribuindo-as para membrana plasmática, lisossomos ou vesículas secretoras (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; ALBERTS, *et al.*, 2005; LEHNINGER, *et al.*, 2003).

Tais características citadas acima nos mostram que a utilização de células eucarióticas para a expressão de proteínas recombinantes possui vantagens, pois com a complexa maquinaria dos eucariotos sabe-se que o produto apresentaria as modificações pós-traducionais necessárias. Porém, as células eucarióticas apresentam desvantagens quando se pensa em rendimento de produção: Normalmente, a quantidade de proteína recombinante produzida por células eucarióticas é bem menor quando comparada à quantidade produzida por bactérias (procariontes). Outro fator de desvantagem é o alto custo para se manter em cultura células eucarióticas.

Células de organismos procarióticos dividem-se rapidamente o que possibilita uma produção em larga escala da proteína a ser expressa. Além disso, o custo para se manter células desses organismos é mais baixo, em relação as células eucarióticas.

Assim, para o presente estudo, decidimos utilizar células de organismos

eucarióticas para a expressão de OSMY1 murina, já que esta proteína é

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

transmembrana e é localizada primariamente no complexo de Golgi. Várias evidências indicam que a proteína QSOX1 é glicosilada e depende do RE e do complexo de Golgi para que sua glicosilação ocorra, além das outras mudanças pós-traducionais (CHAKRAVARTHI, et al., 2007).

1.2.1 VETORES UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO DE QSOX EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Na tentativa de produzir as ferramentas para estudo da proteína QSOX, foi necessária a utilização de dois vetores para que fosse possível expressar as duas formas de QSOX1 em células de mamíferos e assim estudar e entender melhor sua funcionalidade. Os vetores utilizados foram: pSECTag2/Hygro e pcDNA 3.1 (-).

O vetor pSECTag2/Hygro possui um alto nível de expressão e secreção em células de mamíferos; Contém um gene codificador da β -lactamase, que confere resistência à ampicilina. As proteínas recombinantes resultantes apresentam na região N-terminal a sequência líder da cadeia leve Kappa de Imunoglobulinas (Ig k) de murinos para secreção e na região C-terminal pode haver o epítopo *c-myc* seguido de 6 resíduos de histidina para detecção e purificação. No esquema abaixo (figura 2) é possível observar o mapa do vetor Psectag2/Hygro e em seguida a descrição de cada região presente no vetor. Na Figura 3 o mapa do vetor pcDNA 3.1 (-), é apresentado também com suas regiões descritas.

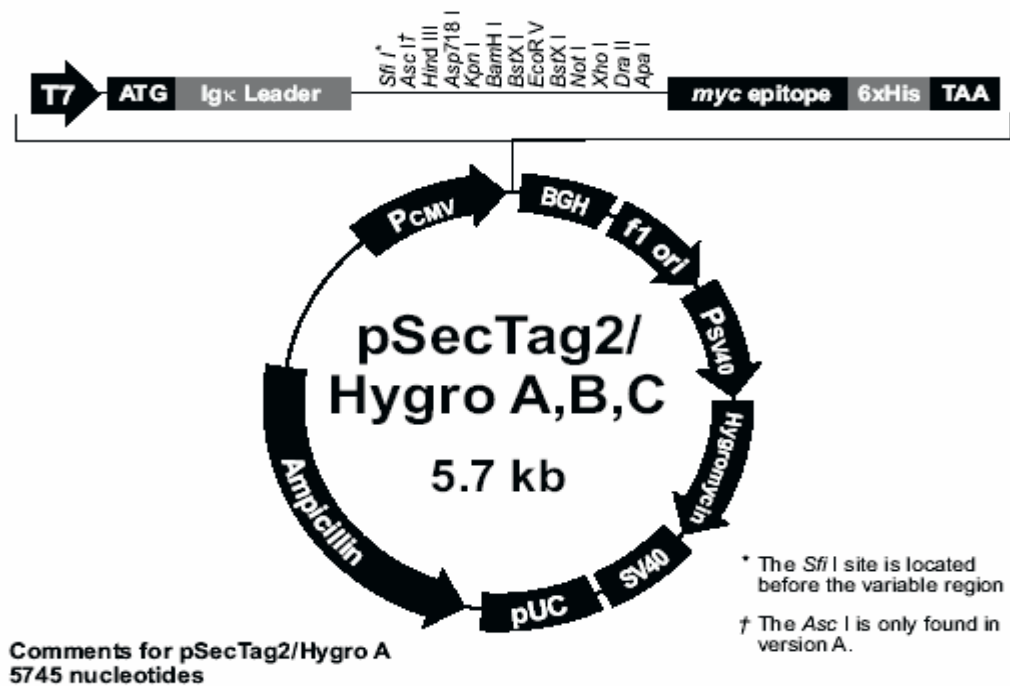


Figura 2: Mapa do vetor pSECTag2/Hygro.

Promotor CMV: Permite um alto nível de eficiência na expressão da proteína recombinante.

T7: Permite a transcrição *in vitro*, a orientação e sequenciamento através do inserto.

ATG: Um códon de iniciação ATG que permite a tradução da proteína de interesse.

Ig k: Sequência líder da cadeia Kappa de Imunoglobulina murina permitindo a secreção da proteína de fusão.

Múltiplos sítios de clonagem: Possui múltiplos sítios de clonagem que possibilitam a inserção do gene de interesse e facilitam a clonagem.

myc epitope: Epítipo *c-myc* que permite a detecção da proteína com o anticorpo anti-*myc*.

6xHis: Possui uma etiqueta de polihistidina para purificação da proteína através cromatografia ametal imobilizado (N^{+2} agarose), além da possibilidade de detecção com anticorpo anti-His.

BGH: sítio de *priming reverse* BGH que possibilita a sequenciamento através do inserto, um sinal de poliadenilação de BGH para um eficiente transcrição, terminação e poliadenilação do mRNA.

Psv40: Início do promotor e origem de SV40 permitindo uma alta eficiência na expressão do gene de resistência higromicina e replicação episomal em células que expressão SV40 e o antígeno T.

Hygromycin: Gene de resistência a higromicina que seleciona células de mamíferos transfectadas de forma estável.

SV40: Sinal de poliadenilação SV40 eficiente na transcrição, terminação e poliadenilação de mRNA.

Origem Puc: Responsável pelo alto número de cópias e replicações em *E.coli*.

Ampicillin: Gene de resistência a ampicilina (β -lactamase) que seleciona bactérias (*E.coli*) transformadas com o vetor Hygro.

Todas estas informações foram retiradas do Catálogo V790-20 e V795-20 disponível no *site* do fabricante www.invitrogen.com

O vetor pcDNA 3.1 (-) deriva do vetor pcDNA3 e é conhecido por possuir um alto nível transitório e estável de expressão em células de mamíferos.

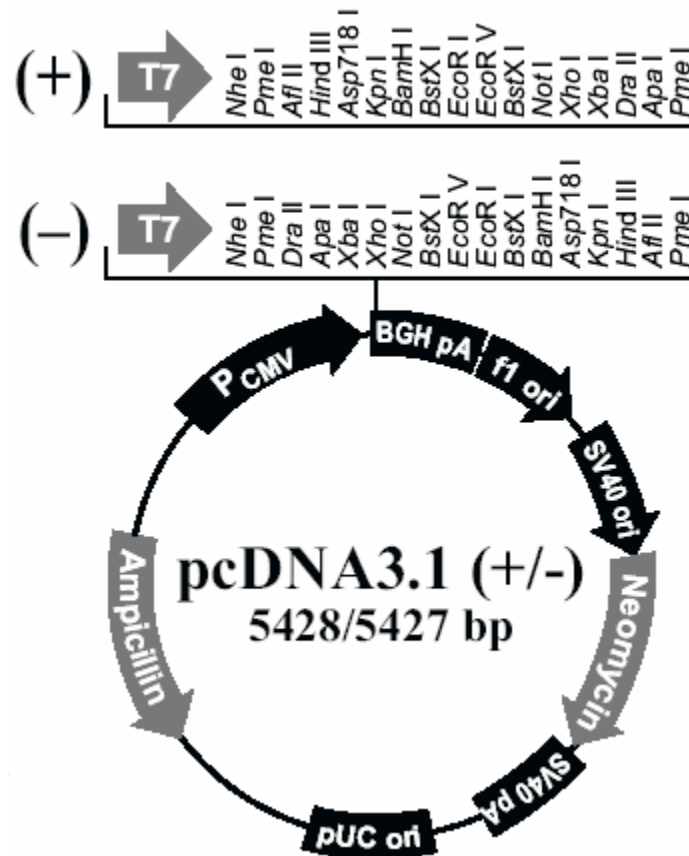


Figura 3: Mapa do vetor pcDNA3.1 (-)

Promotor CMV: Permite um alto nível de eficiência na expressão da proteína recombinante.

T7: Permite a transcrição *in vitro*, a orientação e sequenciamento através do inserto.

Múltiplos sítios de clonagem: Possui múltiplos sítios de clonagem que possibilitam a inserção do gene de interesse e facilitam a clonagem.

BGH pA: Possibilita uma eficiente transcrição, terminação e poliadenilação do mRNA.

Neomycin: Gene de resistência a neomicina que seleciona células de mamíferos transfectadas de forma estável.

Psv40 pA: Início do promotor e origem de SV40 permitindo uma alta eficiência na expressão do gene de resistência neomicina e replicação episomal em células que expressam SV40 e o antígeno T.

Origem Puc: Responsável pelo alto número de cópias e replicações em *E.coli*.

Ampicillin: Gene de resistência a ampicilina (β -lactamase) que permite a seleção de bactéria (*E.coli.*) transformadas com o vetor.

Assim, a expressão das duas formas de QSOX1 de camundongo, a longa (aqui denominada de QSOX V1) e a curta (aqui denominada de QSOX V2), através do vetor pSECTag2/Hygro, irá produzir essas enzimas secretadas no meio de cultura (graças a seqüência líder da cadeia leve K), contendo na região C-Terminal o epítipo *c-myc*, seguido de 6xHis. Com anticorpo anti-*c-myc* disponível comercialmente e já padronizado, será possível realizar a detecção dessas proteínas em vários ensaios e a cauda de 6xHis possibilitará a purificação destes recombinantes através de cromatografia a metal imobilizado.

Alternativamente, a expressão de QSOX V1 e QSOX V2 através do vetor pcDNA 3.1 (-) possibilitará a produção destas enzimas sem a presença de regiões (etiquetas) adicionais, o que não irá ajudar no reconhecimento e nem na purificação, mas poderá favorecer uma conformação e atividade mais parecidas com as enzimas nativas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construção de vetores para a superexpressão da proteína QSOX1 (V1 e V2) em células de mamíferos.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtenção do desenho dos iniciadores para realização da amplificação por PCR das variantes V1 e V2 da proteína QSOX;
2. Amplificação dos insertos para realização da construção dos vetores;
3. Construção dos vetores através de clonagens dos insertos nos plasmídeos para expressão em células de mamíferos;
4. Transfecção dos vetores obtidos em células HEK 293T pelo método de co-precipitação com cálcio, para verificar a expressão das proteínas recombinantes;

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS BALB C

O RNA total foi extraído de 2 cérebros de camundongos Balb C com o auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA), que baseia-se no método descrito por CHOMEZYNSKI, 1993. Resumidamente, os cérebros foram homogeneizados com trizol numa proporção de 1 ml de trizol para cada 50 a 100 mg de tecido e incubado por 5 minutos a 20° C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionado 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de trizol utilizado, com posterior agitação por turbilhonamento durante 15 segundos. Em seguida, a amostra foi mantida em repouso por 3 min e então centrifugada por 10 min a 10000 x g a 4° C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela foi adicionado 0,5 ml de isopropanol para cada 1 ml de trizol utilizado inicialmente. Após incubação por 10 min a 20° C, a amostra foi novamente centrifugada por 10 min a 10000 x g a 4° C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol 75%. Após nova centrifugação de 5 min a 7500 x g a 4° C, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado foi mantido em câmara de fluxo laminar até secagem. O RNA obtido foi dissolvido com 50 µl de água tratada com DEPC. Todo o procedimento de extração de RNA foi realizado em câmara de fluxo laminar. A quantificação do RNA foi realizada através de espectrofotômetro (260 nm).

3.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

Em tubo adequado para reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi adicionado Oligo dT ("Primer") e RNA total (1 µg), numa reação com volume final de 5 µl com água DEPC - tratada. A amostra foi incubada a 70 °C por 5 min para que ocorresse a desnaturação do RNA e então colocada imediatamente em gelo. Foi

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

preparada uma mistura de tampão ótimo para transcriptase reversa (1X), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (mistura de nucleotídeos trifosfato: A,T,C,G - 0,5 mM) (Promega, Madison WI, EUA), inibidor de RNase (20U) (RNaseOUT –Invitrogen), em um volume final de 15 µl, que foi então adicionado aos 5 µl iniciais. Esta mistura foi bem homogeneizada e submetida ao seguinte ciclo em termociclador: 25°C/5 min, 42°C/60 min e 70°C/15 min. Com o produto formado (cDNA) foram realizadas as reações de PCR com os iniciadores específicos para QSOX V1 e QSOX V2. (Ver a seguir):

3.3 DESENHO DE INICIADORES PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS VARIANTES 1 E 2 DA PROTEÍNA QSOX.

1) mQsox-EcoRI-F (para clonar no pcDNA 3.1 (-),no sítio de *Eco* RI – serve para v1 e v2)

5'CG GAATCC AGG ATG AGG AGG TGC GGC3'

Iniciador *forward* contendo a sequência de clivagem da enzima *Eco* RI que foi utilizado para a amplificação de insertos para clonagem no plasmídeo pcDNA 3.1 (-). Este iniciador pode ser utilizado para a amplificação das variantes 1 e 2 da QSOX. É importante mencionar que esse iniciador liga-se na região 5' de ambos os cDNAs antes do ATG inicial, pois possui uma sequência KOZAK necessária para a ligação dos ribossomos durante a tradução (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

2) mQsox v1-Hind-RA (para clonar no pcDNA 3.1 (-),no sítio *Hind* III- só para v1)

5'CCC AAGCTT TCAGGCT GTGGGGTAAC TAG 3'

Iniciador *reverso* contendo a sequência de clivagem da enzima *Hind* III que foi utilizado para a amplificação dos insertos para clonagem no plasmídeos pcDNA 3.1 (-). Este iniciador só pode ser utilizado para a amplificação da variante 1 da QSOX.

3) mQsox v2-Hind-RA (para clonar no pcDNA 3.1 (-),no sítio *Hind* III- só para v2)

5'CCC AAGCTT TCACAAG AGCAGCTCGG GG 3' (28 nt)

Iniciador *reverso* contendo a seqüência de clivagem da enzima *Hind* III que foi utilizado para a amplificação dos insertos para clonagem no plasmídeo pcDNA 3.1 (-). Este iniciador só pode ser utilizado para a amplificação da variante 2 da QSOX.

4) mQSOX-Hind-F (para clonar em *Hind* III no pSECTag2/Hygro),serve para v1 e v2.

5' CCC AAGCTT G GCCCGGCTCTCAGTGCTC3' (28 nt)

Iniciador *forward* contendo a seqüência de clivagem da enzima *Hind* III que foi utilizado para a amplificação dos insertos para clonagem no plasmídeo pSECTag2/ Hygro. Ele permite a amplificação do fragmento de cDNA correspondente a QSOX a partir do aminoácido 33 (Ala 33), já que o peptídeo sinal (aa 1 ao aa 33) é clivado e se fosse adicionado iria provocar a clivagem da seqüência líder para secreção. Este iniciador também permite a amplificação das variantes 1 e 2 da QSOX.

5) mQxox v.1 Xho R (para clonar com *Xho* I em 3' no pSECTag2/Hygro – só para v1)

5'CCG CTCGAG C GGCT GTGGGGTAAC TAG 3' (27 nt)

Iniciador *reverso* contendo a seqüência de clivagem da enzima *Xho* I que foi utilizado para a amplificação dos insertos para clonagem no plasmídeo pSECTag2/Hygro. Este iniciador só pode ser utilizado para a amplificação da variante 1 da QSOX. Ele possui nucleotídeos extras para a manutenção da fase aberta de leitura com o epítopo c-myc e 6xHis.

6) mQxox v.2 Xho R (para clonar 3' Xho I em pSECTag2/Hygro só para v2)

5'CCG CTCGAG C CAAG AGCAGCTCGG GG 3' (26 nt)

Iniciador *reverso* contendo a seqüência de clivagem da enzima *Xho* I que foi utilizado para a amplificação dos insertos para clonagem no plasmídeo pSECTag2/Hygro. Este iniciador só pode ser utilizado para a amplificação da variante 1 da QSOX. Ele possui nucleotídeos extras para a manutenção da fase aberta de leitura com o epítipo c-myc e 6xHis.

3.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA QSOX V1 E V2 E EXTRAÇÃO DO INSERTO PARA CONSTRUÇÃO DO VETOR

Com o cDNA obtido através da RT-PCR e os iniciadores desenhados foram realizadas PCRs para obtenção de insertos para a construção dos vetores. Em um tubo de reação de PCR, foi adicionado aproximadamente 1 µg de cDNA total de camundongo, tampão ótimo da enzima *Pfu* (na concentração final de 1x), MgCl (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), primers específicos para QSOX (descritos acima) (0,4 mM), enzima *Pfu* (1 U/L) e água q.s.p. 25 µl. As reações foram submetidas a ciclos de: 95 °C por 3 min, 95 °C por 45 seg, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 2 min 30 seg, num total de 38 ciclos e finalmente, 72 °C por 10 min. Os produtos das reações foram separados eletroforicamente em gel de agarose 0,8% e o DNA presente nas bandas referentes ao DNA codificador da proteína QSOX foi extraído com auxílio do kit de gel extração Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf – Hamburg - Germany).

3.5 DIGESTÃO FRAGMENTOS QSOX E DOS PLASMÍDEOS

3.5.1 Preparação do Inserto

Após a amplificação dos fragmentos de QSOX, os plasmídeos e os fragmentos obtidos foram digeridos com auxílio de enzimas de restrição anteriormente

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

determinadas. As enzimas utilizadas foram: *Hind* III (0,3U/ μ l), *Xho* I (0,3 U/ μ l) e *Eco* RI, (0,3 U/ μ l) conforme os sítios inseridos em cada produto amplificado. Foram utilizadas duas endonucleases distintas (para cada inserto ou plasmídeo), para que houvesse um direcionamento correto na ligação do inserto com o plasmídeo, facilitando, portanto, a obtenção da construção desejada.

3.5.2 Preparação do vetor

Para o plasmídeo pcDNA 3.1 (-), as enzimas de restrição utilizadas foram *Eco* RI e *Hind* III (Fermentas) e para o plasmídeo pSECTag2/Hygro foram utilizadas as enzimas *Hind* III e *Xho* I (Fermentas). Em ambas reações partiu-se de 8 μ g de vetor. As digestões foram realizadas em um volume final de 50 μ l, com 10 unidades de cada enzima (Fermentas), durante 16 horas, a 37° C. A inativação da reação de digestão foi realizada durante 20 min a uma temperatura de 85° C. Após a inativação das enzimas de restrição por aquecimento, os vetores foram ainda destituídos do seu fosfato da região 5', usando a CIAP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase"-Fermentas) para evitar a re-ligação. Para isso, 3 unidades desta enzima foram adicionadas ao próprio tubo onde ocorreu a reação de digestão. A desfosforilação ocorreu durante 1 hora, a 37° C. Após digestão e desfosforilação, os vetores foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo para verificar a eficiência das digestões e a integridade dos plasmídeos. As bandas correspondentes aos vetores linearizados foram purificadas do gel, através do kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 LIGAÇÃO DO cDNA AOS VETORES pcDNA 3.1 (-) E pSEC-Tag Hygro

Os insertos e os vetores após digestão, purificação e quantificação foram então unidos em uma reação de ligação na proporção de 5 moléculas de inserto para cada

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

molécula do vetor, partindo-se de 50ng de plasmídeo. A enzima T4 DNA ligase (3 U/ μ l) foi utilizada na reação de ligação (volume final de 20 μ l), durante 16 horas, a 4° C, e seu respectivo tampão ótimo de atividade. Após a reação, a enzima foi inativada por 10 min a 65° C.

3.7 PRECIPITAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PLASMÍDEO-INSERTO

Antes do procedimento de purificação da construção, 2 μ l do produto da ligação foi reservado. Este procedimento foi necessário para que ainda houvesse material caso a purificação não fosse adequada.

A reação de construção foi precipitada com uma solução de acetato de sódio pH 6,0 (0,3 M) e 3 partes de etanol absoluto gelado. Após homogeneização com auxílio de agitação por turbilhonamento, foi deixado à temperatura inferior a -20 °C por 30 min e então centrifugado com uma rotação de 20000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento obtido foi lavado com etanol 70 % gelado e novamente centrifugado a 20000 x g por 5 min a 4 °C. Após nova lavagem com etanol 70%, foi retirado o máximo possível do álcool presente. O sedimento foi mantido em estufa a 37°C para a eliminação total do etanol. Os plasmídeos foram ressuspensos em 5 μ l de água e homogeneizado por cerca de 10 min com auxílio de agitação por turbilhonamento.

3.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

A cepa bacteriana de *E.coli* DH5- α eletrocompetente (30 μ l) foi eletroporada em eletroporador (Gene Pulser X-Cell, BioRad), para entrada da construção do plasmídeo com inserto de estudo (1 μ l) na bactéria. Após eletroporação, as bactérias foram

colocadas em meio LB líquido (10 g/l de Triptona, 5g/l de extrato de levedura, 10 g/l de NaCl) e mantidas a 37 °C por 1 hora (período de recuperação).

As bactérias recuperadas foram plaqueadas em meio LB ágar (15g / l) suplementado com ampicilina (100 µg/ ml). O plaqueamento foi feito em duas placas. Na primeira foi plaqueado 100 µl da cultura de bactérias e os 900 µl restantes foram centrifugados e o precipitado plaqueado em outra placa. Cada uma das placas com a suspensão bacteriana foi friccionada com alça de Drigalski (estéril) até completa absorção (secagem) do líquido. As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 h.

3.9 PCR DE COLÔNIA

As colônias que cresceram nas placas foram submetidas a uma PCR de colônia para a verificação da presença do inserto desejado nos vetores transformados. Cada colônia foi recolhida com auxílio de palito de madeira estéril e colocada em tubos contendo 0,05 ml de meio LB contendo ampicilina 100 µg/ ml. Um microlitro dessa suspensão foi submetido à reação com os seguintes componentes: tampão ótimo da enzima Taq polimerase (1x), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), iniciadores específicos para QSOX (0,4 mM), enzima *Taq* DNA polimerase (1 U/L) e água para volume final de 10 µl. Esta mistura foi incubada em termociclador a 95° C por 3 min, 38 ciclos de 95° C por 45seg / 55° C por 45seg / 72° C por 2 min e 30 seg e finalmente 72° C por 10 min. O produto foi separado eletroforéticamente em gel de agarose 0,8 %,corado com brometo de etídeo e visualizado com auxílio de luz UV.

3.10 OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO DE VETORES ATRAVÉS DA PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA

As amostras positivas para a presença do inserto de QSOX foram plaqueadas em meio LB contendo 100 µg/ml ampicilina (placa “master plate”). A partir da placa “master plate” os clones escolhidos foram repicados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo líquido LB/amp (100 µg/ ml) e incubado por 16 h a 37° C (em incubadora 430 RDB tipo “shaker” Nova Ética, Campinas, Brasil) em tubos de 5 ml com tampa de rosca. Cada cultura (com crescimento saturado) foi centrifugada (14000 x g por 1 min) a temperatura ambiente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes do kit para Miniprep da Invitrogen (Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 SEQÜENCIAMENTO

Para reação de amplificação do cDNA para sequenciamento foi utilizado o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City CA, 32 EUA) em gel de sequenciamento em parceria com o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (São Paulo-SP). Além dos iniciadores que foram utilizados para a amplificação do DNA da QSOX, foram utilizados outros iniciadores internos ao inserto para que todo o inserto fosse sequenciado.

3.12 PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA CONSTRUÇÃO pSECTag2/Hygro QSOX V2

Esta purificação em larga escala foi realizada apenas com a variante 2 (QSOX V2), para teste, utilizando o “kit” com QIAprep Spin Maxiprep kit (Qiagen). A colônia contendo o vetor pSEC-Tag Hygro-QSOX V2 foi colocada em 5ml de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml), e incubada por aproximadamente 7 horas a temperatura de 37° C (pré-inóculo). Após o período de crescimento 1 ml do pré-inóculo foi colocado em 300ml de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml) para incubação à 37° C, sob vigorosa agitação, durante 16 h.

No dia seguinte as bactérias foram centrifugadas a 6000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Após ressuspender o *pellet* bacteriano em 10 ml do tampão P1 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) gelado, adicionou-se 10 ml do tampão P2 (200mM NaOH, 1% SDS) ,homogeneizando delicadamente por inversão por 10 vezes e incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação adicionou-se 10 ml de P3 (3.0 M acetato de potássio, pH5.5) gelado, homogeneizou-se por inversão 10 vezes e depois incubou-se em gelo por 20 minutos,nessa fase ocorre a precipitação do DNA genômico , proteínas e *debris* celulares.

Passado os 20 minutos centrifugou-se por 30 minutos a 15000 rpm,em seguida passou-se o sobrenadante para outro tubo que foi centrifugado novamente por 15 minutos a 15000 rpm. Enquanto ocorria a centrifugação passou-se 10 ml de QTB (750 mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton^R x-100) na coluna .O sobrenadante foi colocado na resina da coluna para passar totalmente. Quando a passagem foi completada lavou-se 2 vezes a resina com 30 ml de tampão QC (1.0 M NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol).

O DNA plasmidial foi eluído com 15 ml de QF (1.25 M NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0) e na seqüência adicionou-se 10,5 ml de isopropanol e inverteu-se cuidadosamente o tubo. Em seguida centrifugou-se por 30 minutos a 15000 rpm a 4° C, descartando-se o sobrenadante após a centrifugação. Etanol 70 % (10 ml) foi adicionado com cuidado

pela parede oposta ao pellet. Centrifugou-se por mais 30 minutos a 4°C em 15000 rpm. O sobrenadante foi descartado, colocou-se um parafilme com pequenos furos sobre o tubo e este foi colocado na estufa 37°C *over night*. A construção foi, então, ressuspensa em 400 µl de água ultrapura.

3.13 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX VARIANTE 2 EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Células HEK 293T foram transfectadas por co-precipitação de cálcio com os vetores obtidos. Setecentos e cinquenta microlitros de água milliQ autoclavada foram colocadas em tubo cônico de 15 ml e foram cuidadosamente adicionados 12 µg do vetor. Então, foi adicionado 250 µl de CaCl₂ (1M) pelas paredes do tubo e 1000 µl de BBS (50mM BES, 280mM NaCl, 1,5 mM Na₂ HPO₄ 2H₂O, água deionizada) (2x) em jato forte. Após 5 min, foram adicionados nestes tubos cônicos 8 ml de meio MEM com 10% de SFB (soro fetal bovino – Cultilab). Após a retirada do sobrenadante das células das placas de cultura, a solução de transfecção anteriormente preparada foi adicionada delicadamente pelas paredes das placas com aproximadamente 80% de confluência de células HEK 293T. As células foram incubadas em estufa com 3% de CO₂ a 37° C, por período de 5-6 horas. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas com 5 ml de PBS estéril. Após a retirada do PBS, 8 ml de meio MEM contendo 10% SFB foi adicionado. No dia seguinte, o aspecto das células foi observado. Após 48 horas da transfecção, os sobrenadantes das placas foram coletados e as células lisadas. Os sobrenadantes foram concentrados em um ultraconcentrador Amicon ultra (Milipore, USA) (4 ml foram concentrados para 0,2 ml) e analisados, junto com os extratos, quanto à presença da proteína QSOX através de “Western Blotting,” utilizando um anticorpo anti-QSOX.

3.14 ENSAIO DE “WESTERN BLOTTING”

Quarenta microlitros dos sobrenadantes concentrados das células transfectadas e aproximadamente 60 µg dos extratos celulares foram submetidos a separação eletroforetica por SDS-PAGE 10% e transferidos e imobilizados em membrana de nitrocelulose. Após coloração da membrana com Ponceau-S para avaliação da eficiência da transferência, a membrana foi bloqueada em temperatura ambiente, durante 1 hora com TBST (120mM NaCl; 20mM Tris; 0,05 % de Tween 20) , contendo 5% de leite desnatado e posteriormente incubada com anticorpo primário α - QSOX (PORTES *et al.*, 2007) (diluição 1:1000), durante à noite , à 4° C. Lavou-se a membrana 5 vezes (3 minutos cada lavagem) com TBST. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário, conjugado com a enzima HRP – “Horseradish peroxidase” (Santa Cruz), (diluição 1:4000), durante 1 hora, a temperatura ambiente. Nova série de 5 lavagens com TBST foi realizada, prosseguindo a revelação da membrana com substrato adequado para reação Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate HRP (Pierce). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequando.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES

Para se obter a sequência de DNA codificante referente à proteína QSOX expressa em células eucarióticas, foi preciso extrair o RNA mensageiro (mRNA) de células de camundongo (animal escolhido) que sabiamente expressavam essas proteínas. Portanto, como a expressão de QSOX no cérebro de camundongos apresentada por estes animais não varia de acordo com a idade (THORPE *et al.*, 2002), escolheu-se, pela facilidade, realizar a extração de mRNA de animais adultos. O mRNA total foi extraído com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA), que baseia-se no método descrito por CHOMEZYNSKI, 1993. Foram utilizados 2 cérebros de animais Balb C para o procedimento. Com auxílio da enzima transcriptase reversa, o mRNA obtido serviu de molde para a obtenção de cDNA codificador de todas as proteínas expressas no cérebro de camundongos adultos, inclusive da proteína QSOX.

Para realizar a amplificação dos fragmentos de cDNA codificante da proteína QSOX foi preciso de iniciadores específicos. O objetivo foi obter 4 construções diferentes, utilizando-se os plasmídeos pcDNA 3.1(-) e pSEC-TAG HYGRO e as duas variantes da proteína QSOX V1 e V2. Portanto, as construções desejadas foram **pcDNA 3.1(-) + QSOX V1**, **pcDNA 3.1(-) + QSOX V2**, **pSECTag2/Hygro + V1** e **pSECTag2/Hygro + V2**. Para isso, foram desenhados 6 iniciadores diferentes, sendo 2 *forwards* e 4 reversos. Os iniciadores *forwards* servem para amplificação de ambas as variantes da QSOX, pois o início da sequência de bases é idêntico para V1 e V2. Já para o iniciador reverso foi preciso desenhar um iniciador diferente para cada variante, pois a QSOX V2 sofre um *splicing* alternativo, perdendo o final da sua sequência, diferindo, portanto, da sequência final da QSOX V1. De acordo com a análise dos mapas dos plasmídeos e dos insertos e com a disponibilidade de enzimas existentes no laboratório, foram escolhidos os sítios das enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III

(Fermentas) para serem adicionados nos iniciadores para amplificar os insertos que seriam inseridos no pcDNA 3.1 (-) e as enzimas *Hind* III e *Xho* I (Fermentas) para os iniciadores dos insertos que seriam amplificados para serem inseridos no pSECTag2/Hygro.

Na primeira PCR realizada, as condições de concentração dos reagentes, tempo e temperaturas foram determinadas de acordo com outras reações de PCR e informações já descritas anteriormente. Nesta primeira reação foi utilizado 1 µl do cDNA obtido, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada um dos iniciadores (*forward* e reverso) e 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase. Os tempos e temperaturas utilizados foram: 95° C/3 min; (95° C/45 seg; 55° C/45 seg; 72° C/2 min 30 seg) 38 ciclos; 72° C/10 min. Todos os iniciadores foram testados nesta condição. Com esta reação não foi possível a obtenção dos insertos desejados (dados não mostrados).

Com a dificuldade de obtenção da amplificação dos insertos desejados, foi decidido utilizar apenas um par de iniciadores para a padronização da PCR e posteriormente, já com a reação padronizada, testar os outros pares de iniciadores. Os iniciadores escolhidos foram aqueles específicos para amplificar o inserto QSOX V2 para ligação com o plasmídeo pSECTag2/Hygro.

Diante do resultado negativo obtido, decidiu-se realizar algumas modificações no protocolo da PCR. Foi então realizada uma PCR *Hot Start* que é um método para otimizar a produção das amplificações desejadas através da PCR, que ao mesmo tempo em que impede ligações inespecíficas. Isto é feito sem a adição de um componente essencial para que a PCR ocorra, por exemplo, a não adição da *Taq* DNA polimerase. A temperatura ótima desta enzima é 72° C e, assim quando a reação iniciar com a desnaturação do DNA a 95°C, há a possibilidade da enzima começar agir quando a temperatura passar pelos 72° C, o que pode favorecer anelamento inespecífico dos oligonucleótidos e amplificação inespecífica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Fez-se uso da PCR *Hot Start* manual a qual consistiu na mistura sem a presença do cDNA e este só foi acrescentado após a temperatura atingir 95° C no termociclador. As outras condições foram mantidas. Uma banda de intensidade muito fraca foi observada (dados não mostrados).

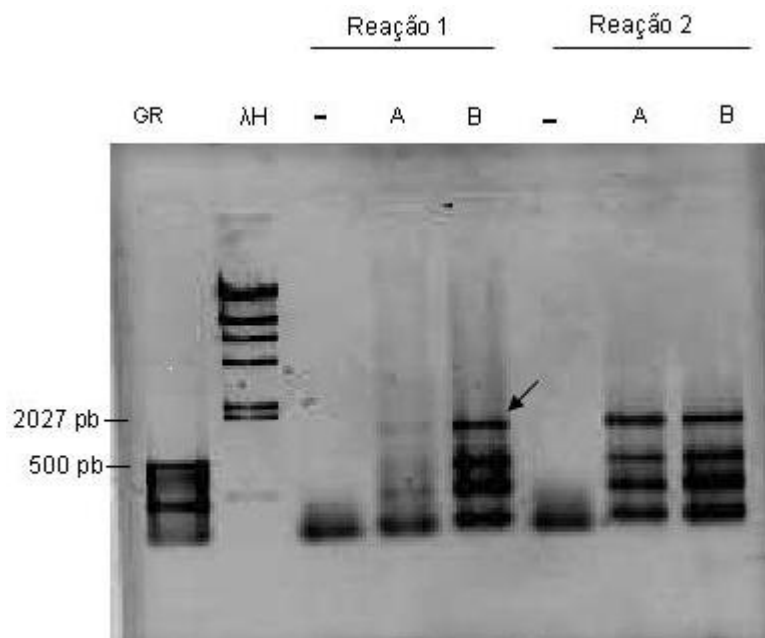


FIGURA 4: Padronização: amplificação do inserto QSOX variante 2 com *Taq Platinum*

Após obtenção do cDNA através do RNA extraído de cérebros de camundongos, este cDNA foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos de interesse (QSOX variante 2) através da técnica de PCR. Nesta reação foram utilizados os iniciadores para amplificar o fragmento da QSOX variante 2 que seria inserida no vetor pSECTag2/Hygro. O produto da amplificação foi separado eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e visualizado através de iluminação com luz UV (ultravioleta). As duas primeiras canaletas apresentam os marcadores moleculares Gene Ruller (GR) e Lambda Hind (λ H) respectivamente. As canaletas (-) apresentam os controles negativos, nos quais todos os reagentes foram adicionados, exceto o cDNA. As canaletas seguintes apresentam os produtos amplificados a partir de cDNAs que obtidos em dias diferentes (A e B). Reação 1: sem DMSO; Reação 2: com DMSO. A flecha indica o inserto.

Com o objetivo de melhorar o resultado, 5% DMSO (dimetilsulfóxido) foi acrescentado na reação. Sabe-se que o DMSO pode auxiliar na reação evitando a formação de conformações secundárias no DNA molde e nos oligonucleotídeos, permitindo assim um melhor pareamento entre essas moléculas. Porém, nenhuma banda na altura esperada foi visualizada (dados não mostrados). Decidiu-se, então utilizar a enzima *Taq platinum*, que é uma enzima *Hot start*. Esse evento se dá graças a um anticorpo específico que está acoplado à enzima, permitindo que esta só tenha atividade quando a temperatura atinge 95°C. Nesta temperatura os anticorpos desnaturam-se e, desligam-se da enzima que se torna ativa. As condições da PCR foram mantidas e foram realizadas reações com e sem DMSO. cDNAs extraídos em dias diferentes foram utilizados. Nas reações em que não se utilizou o DMSO, somente uma reação mostrou-se satisfatória enquanto que nas reações utilizando-se DMSO,

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

ambas as reações demonstraram uma banda na altura esperada do inserto (1681pb) (figura 4). Outras bandas não específicas também apareceram no gel.

Com o intuito de conseguir um inserto livre de mutações, foi realizada uma PCR com condições idênticas às citadas anteriormente, porém com a utilização da enzima *Pfu*, que possui atividade exonuclease 3'-5', ou seja, que corrige as bases que foram acidentalmente inseridas incorretamente. Todos os pares de iniciadores foram testados nesta reação. De todos os insertos desejados, apenas um não pôde ser amplificado pela padronização obtida (figura 5). Este inserto, corresponde ao fragmento referente à QSOX V2, que seria inserido no pcDNA 3.1(-), o qual foi então temporariamente excluído dos experimentos. Os fragmentos de interesse são evidenciados por flechas na figura 5. Outras bandas inespecíficas foram visualizadas.

Os insertos de interesse foram então recortados do gel de agarose e extraídos através do “kit” de gel extração Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf – Hamburg - Germany). Outras PCRs idênticas a essas foram realizadas até que quantidades de DNA suficientes fossem obtidas.

Os insertos e os plasmídeos foram então submetidos à digestão com as enzimas anteriormente determinadas. Os produtos das digestões foram então separados eletroforeticamente e novamente os DNAs extraídos do gel conforme acima citado. Após quantificação do DNA, a ligação entre inserto e plasmídeo foi realizada. Foi utilizado aproximadamente 50 ng de plasmídeo e aproximadamente 5 vezes mais moléculas de inserto em relação aos plasmídeos. A ligação foi realizada com auxílio da enzima T4 DNA ligase durante 16 h a uma temperatura de 16° C. As reações foram então precipitadas com acetato de sódio e etanol e ressuspensas em 5µl de água. Esta precipitação tornou-se necessária para concentrar os produtos de ligação e para retirar o sal da reação e permitir uma maior eficiência durante a eletroporação. Com as construções purificadas, foram realizadas eletroporações em bactérias *E.coli* DH5-α. As bactérias que sofreram eletroporação com as construções foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/ ml.

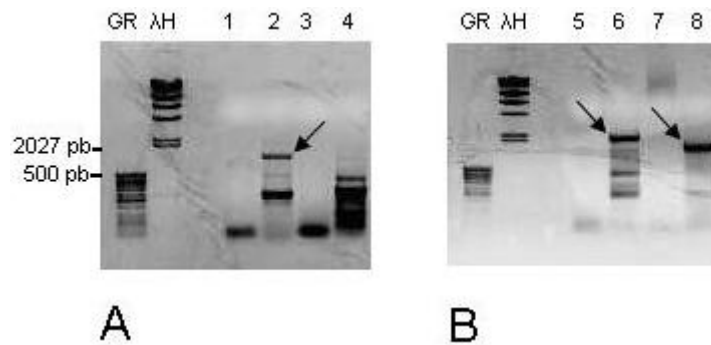


FIGURA 5: amplificação dos insertos (QSOX), utilizando *Pfu*.

Após obtenção do cDNA através do RNA extraído de cérebros de camundongos, este cDNA foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos de interesse (QSOX variante 1 e variante 2) através da técnica de PCR. Os produtos obtidos foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e visualizados através de iluminação com luz UV (ultravioleta). GR: marcador de peso molecular Gene Ruller; λH: marcador de peso molecular Lambda Hind; 1: controle negativo da reação, 2: amplificação do fragmento da QSOX variante (v) 1 para ligar no vetor pcDNA 3.1 (-), 3: controle negativo da reação, 4: amplificação do fragmento da QSOX variante (v) 2 para ligar no vetor pcDNA 3.1 (-), 5: controle negativo da reação, 6: amplificação do fragmento da QSOX variante (v) 1 para ligar no vetor pSECTag2/Hygro, 7: controle negativo da reação, 8: amplificação do fragmento da QSOX variante (v) 2 para ligar no vetor pSECTag2/Hygro. As bandas sinalizadas por flechas apresentam o tamanho esperado para os insertos correspondentes.

4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA E INTEGRIDADE DO INSERTO

As colônias que cresceram no meio contendo ampicilina foram testadas quanto à presença do inserto através de uma reação de PCR de colônia. As colônias foram pinçadas com o auxílio de palitos estéreis e colocadas em 50 µl de meio LB contendo ampicilina. Um microlitro desta solução de bactérias foi utilizado para realizar a PCR de colônia com iniciadores específicos para os insertos. Esta reação foi procedida com as condições de tempo e temperaturas descritas anteriormente para a amplificação dos insertos. Os produtos das reações foram separados eletroforéticamente e analisados quanto à presença do inserto (figura 6).

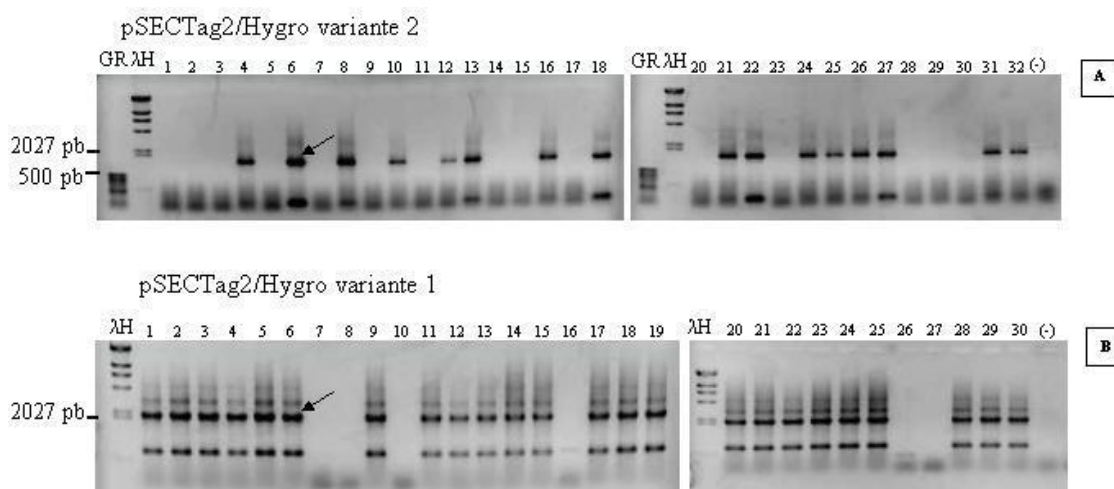


FIGURA 6: PCR de colônia

Após a eletroporação dos plasmídeos em bactérias DH5-α, e plaqueamento em meio LB contendo ampicilina, as colônias que cresceram posteriormente ao período de incubação foram submetidas a uma PCR de colônia. Os produtos da PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e visualizados através de iluminação com luz UV. As bactérias que incorporaram o plasmídeo contendo o inserto apresentaram uma banda no gel correspondente ao tamanho do inserto da QSOX utilizado. O produto da PCR de colônia das bactérias eletroporadas com o plasmídeo pSECTag2/Hygro ligado ao inserto da QSOX variante 2 apresentou 16 colônias positivas em 31 testadas (A). A banda correspondente ao inserto é evidenciada na colônia número 6 (A e B) com uma flecha. Em B, tem-se o produto da PCR de colônia das bactérias eletroporadas com o pSECTag2/Hygro ligado ao inserto da QSOX variante 1. Os números são correspondentes aos números designados a cada colônia obtida nas placas de cultura. (-): controle negativo; (+): controle positivo; λH: marcador de peso molecular lambda-Hind; GR: marcador de peso molecular Gene Ruller.

Apenas duas construções apresentaram colônias positivas para o inserto. Uma foi a construção do plasmídeo pSECTag2/Hygro contendo o inserto QSOX V2 (figura 6A) e a outra foi a construção do plasmídeo pSECTag2/Hygro contendo o inserto QSOX V1 (figura 6B). Observou-se tanto na figura 6A quanto na 6B, a presença de bandas com aproximadamente 200pb, as quais podem corresponder aos produtos não específicos de amplificação. Algumas colônias positivas para a presença do inserto foram escolhidas e submetidas à mini preparações para obtenção de plasmídeos purificados. Estes plasmídeos foram digeridos com as enzimas utilizadas anteriormente e os plasmídeos escolhidos liberaram os insertos vinculados (figura 7), com exceção da construção pcDNA 3.1 (-)-QSOX V1: o inserto esperado deveria ter 2244 pb e essa construção liberou, após digestão, um inserto menor, de ~500pb, condizente com a não amplificação nos PCRs de colônias (dados não mostrados).

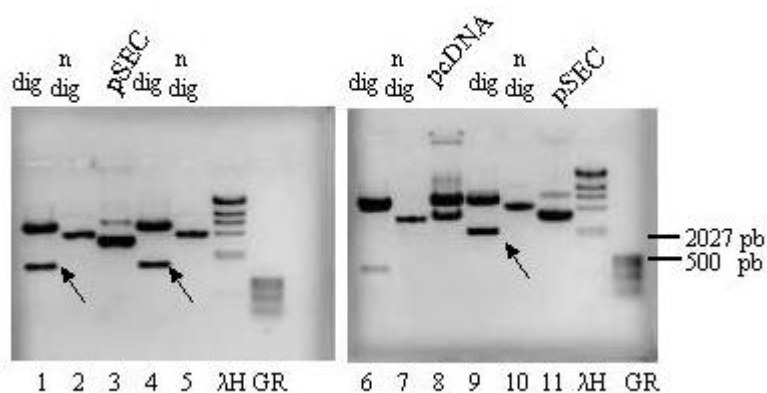


FIGURA 7: digestão do plasmídeo com liberação do inserto

Após a realização de mini preparações para obtenção das construções purificadas das colônias escolhidas, estas foram digeridas com as enzimas de restrição utilizadas no processo para a confirmação da presença do inserto desejado. Para as colônias obtidas da construção pSECTag2/Hygro + QSOX V1 (canaletas 9 e 10) e pSECTag2/Hygro + QSOX V2 (canaletas 1, 2, 4 e 5) foram liberados insertos de tamanhos iguais aos esperados (os insertos estão evidenciados através de flechas). Já para a construção pcDNA 3.1(-) + QSOX V1 (canaletas 6 e 7), a banda correspondente ao inserto liberado não possui o tamanho esperado (~500pb ao invés de 2244 pb).

Para analisar a integridade dos insertos, os mesmos foram submetidos à reações de sequenciamento e a análise das seqüências encontram-se resumidas na tabela I. O inserto QSOX V1 mostrou-se íntegro, com a seqüência original sem nenhuma mutação. Já o inserto QSOX V2 apresentou uma mutação no resíduo 166 (Prolina para Serina).

TABELA I: ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS SEQÜENCIAMENTOS.

Construções	Fase com seqüência líder de Ig K	Fase com <i>c-myc</i> e 6xHis	Observações
pSECTag2/Hygro QSOX V1	Apresenta	Apresenta	Sem nenhuma alteração.
pSECTag2/Hygro QSOX V2	Apresenta	Apresenta	Alteração (mutação) em P→S (aa 166)

4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QSOX EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Enquanto as construções estavam sendo seqüenciadas (no laboratório da Dra. Anamaria Camargo, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo), decidimos realizar um teste de expressão com a construção Psectag2/Hygro QSOX V2 (que após sequenciamento apresentou uma única mutação). Utilizou-se o *kit* Maxiprep da Invitrogen (Pure Link Quick Plamid Maxiprep Kit, Invitrogen) para a purificação desse vetor em larga escala.

O vetor obtido foi utilizado para transfecção de células HEK 293T pelo método de co-precipitação com cálcio. Depois de 48 h decorridos a partir da transfecção, o sobrenadante e as células das placas transfectadas foram recolhidos e analisados. O sobrenadante foi mecanicamente concentrado e as células foram lisadas. Ambos foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi utilizada em reações de imunodeteção. Como controle negativo, extratos e sobrenadantes de células não transfectadas, porém submetidas às mesmas condições, foram analisadas. Também utilizamos um controle positivo, no qual extrato de vesícula seminal de rato (que sabidamente apresenta grandes quantidades de QSOX1) foi separado eletroforéticamente no mesmo gel. Após transferência para membrana de nitrocelulose realizou-se a imunodeteção com anticorpo anti-QSOX (PORTES *et al.*, 2007). Como pode ser visto na figura 8, o anticorpo reconheceu uma banda correspondente à QSOX no extrato de vesícula seminal (~66 kDa), porém não foi possível observar diferenças nos padrões de reconhecimentos pelo anticorpo dos extratos ou sobrenadantes retirados de células transfectadas e não transfectadas. Ou seja, não foi possível observar a presença de uma banda específica correspondente à QSOX V2, nem no sobrenadante e nem no extrato protéico das células transfectadas, com a construção de interesse. Acreditamos em duas possibilidades para a não observação da presença da proteína QSOX V2 recombinante. A primeira seria que a quantidade dessa enzima presente no sobrenadante ou mesmo no extrato não foi suficiente para que houvesse a detecção pelo anticorpo.

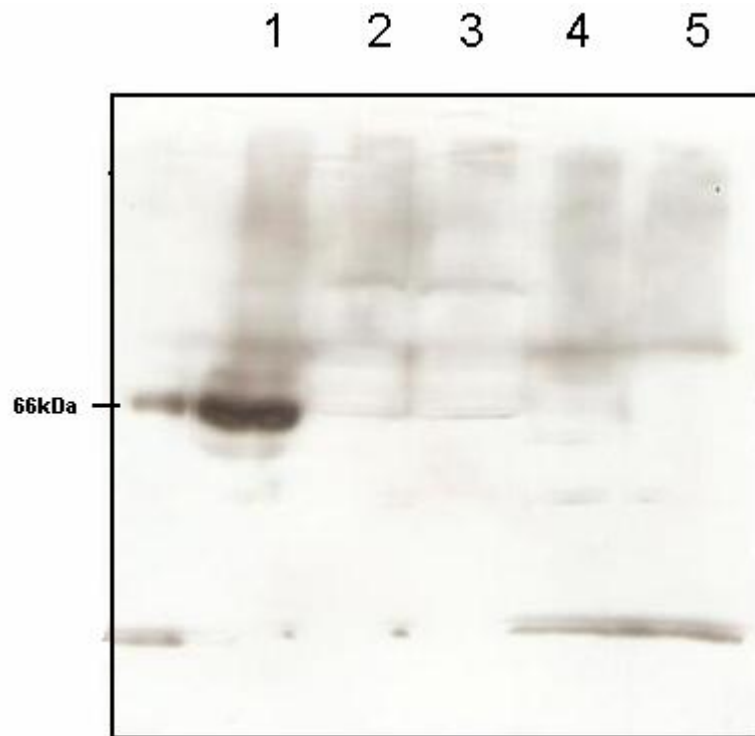


Figura 8: “Western Blotting” para detecção de QSOX V2 expressa em célula heteróloga

Extratos protéicos e sobrenadantes de células HEK 293T transfectadas ou não com o vetor pSECTag2/Hygro foram recolhidos e analisados através de separação eletroforética em SDS-PAGE 10%, seguido de “Western Blotting” com anticorpo anti-QSOX. Canaleta 1: extrato de vesícula seminal de rato (controle positivo); Canaleta 2: extrato de células não transfectadas; Canaleta 3: extrato de células transfectadas; Canaleta 4: sobrenadante de células não transfectadas; Canaleta 5: sobrenadante de células transfectadas.

Uma segunda hipótese seria que a transfecção não foi realizada com sucesso, ou seja, as células não receberam a construção, corroborando com a ausência da expressão da proteína. Assim, outros ensaios parecidos estão sendo repetidos para que uma conclusão possa ser obtida sobre o sucesso ou não da expressão da proteína recombinante nas células heterólogas. Além disso, pretendemos repetir a reação de imunodeteção com anticorpos anti-c-myc e anti-His tag, os quais são comercialmente disponíveis e já bem padronizados. Pretende-se também realizar transfecção com a outra construção, pSECTag2/Hygro QSOX V1, já que essa não apresentou nenhuma mutação.

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados no presente estudo levam às seguintes conclusões:

- Dentre os quatro insertos desejados, três foram eficientemente amplificados, os quais correspondem aos insertos da QSOX V1 para clonagem em pSECTag2/Hygro e pcDNA 3.1 (-) e inserto QSOX V2 para clonagem em pSECTag2/Hygro.
- Foram obtidas duas construções utilizando o plasmídeo pSECTag2/Hygro, uma contendo o inserto codificador da QSOX V1 e a outra contendo o inserto correspondente à QSOX V2.
- Dos vetores obtidos, aquele contendo a variante 1 possui a sequência de nucleotídeos correta e aquele contendo a variante 2 possui apenas uma mutação que altera o resíduo 166 da proteína (uma substituição de Prolina por Serina).
- A proteína QSOX V2 não foi detectada quando células HEK 293T foram transfectadas com o vetor pSECTag2/Hygro-QSOX V2 e outros ensaios serão realizados para verificar essa expressão.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BENAYOUN, B.; ESNARD-FÉVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. J. Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase. **Biol. Chem**, v. 276, p. 13830-37, 2001.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**: Uma introdução. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; WILLER, M.; STILING, C. J.; BULLEID, N. J. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J.* v. 404, p 403-411, 2007.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15 p. 532-4, 536-7, 1993.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERMAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell Growth Differ**, v. 4, p. 483-493, 1993.

COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D. A.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v, 54, p. 460-468, 1998.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; GUDAS, J.; CINA-POPPE, D. A. Regulation of the quiescence- induced genes: Quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochemical and Biophysical**, v. 269, p. 604-610, 2000.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Multidomain flavina-dependent sufhydryl oxidases. **Antioxidantes & Redox Signaling**. v. 8, n 3 and 4, 2006.

HOOBER, K.L., JONEJA, B., WHITE, H.B., THORPE, C. J. A Sulfhydryl Oxidase from Chichen Egg White. **Biol. Chem**, v. 271, p. 30510-16, 1996.

HOOBER, K. L.; SHEASLEY, S. L.; GILBERT, H. F.; THORPE, C. Sufhydril oxidase from egg white. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n 32, p.22147-22150, 1999a.

HOOBER, K. L.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; COPPOCK, D. L.; THORPE, C. J. Homology between Egg White Sulfhydryl Oxidase and Quescin Q6 Defines a New Class of Flavin-linked Sulfhydryl Oxidases. **Biol. Chem**. v. 274, p. 31759-62, 1999b.

INVITROGEN LIFE TECNOLOGIES. pcDNA 3.1 (+), pcDNA 3.1 (-),Catalog nos. v790-20 and v795-20 respectively,version I. Disponível em : <http://www.invitrogen.com> (29 jul 2008).

INVITROGEN LIFE TECNOLOGIES. pSECTAG2/Hygro A, B and C, catalog v 910-20, version C. Disponível em : <http://www.invitrogen.com> (29 jul 2008).

IKEGAMI, C. M. **Produção de bioferramentas para o estudo das proteínas semaforina 5b e QSOX**. 70 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular) – Setro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAIRET-COELLO, G., TURY, A., FELLMAN, D., RISOLDI, P. Y., GRIFFOND, B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. **J. Comp Neurol**, v. 484, p. 403-415, 2005.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **J. Dermatol. Sci**, v.30, p. 50-62, 2002.

MATSUI, M., OSHIMA, M., OSHIMA, H., TAKAKU, K., MANUYAMA, T., YODOI, J., TAKETO, M. M. Early embryonic lethality caused by targeted dissuption of the mouse thioredoxin gene. **Dev Biol**, v. 158, p. 159-165, 1996.

NELSON, D. L.; COX M. M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. Nova Yorque: Sanyer, 2002.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

OSTROWSKI, W. S.; KISTLER, W. S. Properties of a Flavoprotein Sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, v. 19, p. 2639-45, 1980.

PORTES, K. F.; IKEGAMI, C. M.; GETZ, J.; MARTINS, A. P.; NORONHA, L.; ZISCHELER, L. F.; KLASSEN, G.; CAMARGO, A. A.; ZANATA, S. M.; BEVILACQUA, E.; NAKAO, L. S. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **J Mol Hist.** n 9156, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY, 2001.

THORPE, C.; HOOBER, K. L.; RAJE, S.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D. L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch Biochem Biophys**, v. 405, p. 1-12, 2002.

WITTKE, I. R. W.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the *Sulfhydryl Oxidase/Quiescin6* family, regulates sensitization to Interferon γ -Induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 15, p.77427752, 2003.

ZANATA, S. M; LUVISON, A.C.; BATISTA, D. F.; IKEGAMI, C.M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CHAVES, D. F. S.; CARON, L. F.; PELIZZARI, J. V.; LAURINDO, F. R. M.; NAKAO, L. S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Report**, v.10, n 6, 2005.